

ASTL抗体中和ASTL对人宫颈癌ME-180细胞放射敏感性的影响

Effect of neutralizing ASTL with ASTL antibody on radiosensitivity of human cervical carcinoma ME-180 cells

Zhao Shuya, Li Hang, Fan Saijun

引用本文:

赵舒雅, 李航, 樊赛军. ASTL抗体中和ASTL对人宫颈癌ME-180细胞放射敏感性的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2021, 45(12): 773-782. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202009033-00125

Zhao Shuya, Li Hang, Fan Saijun. Effect of neutralizing ASTL with ASTL antibody on radiosensitivity of human cervical carcinoma ME-180 cells[J]. *International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2021, 45(12): 773-782. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202009033-00125

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202009033-00125>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

HBXIP蛋白表达对宫颈癌细胞的增殖能力及放射敏感性的影响

Effects of HBXIP protein expression on the proliferation and radiosensitivity of cervical cancer cells

国际放射医学核医学杂志. 2017, 41(5): 340-346 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.05.007>

异紫堇碱对宫颈癌SiHa细胞增殖和辐射敏感性的影响

Effects of isocorydine on the proliferation and radiosensitivity of cervical cancer SiHa cells

国际放射医学核医学杂志. 2021, 45(5): 291-299 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202004036-00058>

缺氧诱导的UCHL5增强宫颈癌Hela细胞辐射抗性

Hypoxia-induced UCHL5 expression enhanced radioresistance of Hela cells in cervical cancer

国际放射医学核医学杂志. 2021, 45(1): 31-40 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202010021-000011>

褪黑素对人结肠癌细胞辐射敏感性的影响

Effects of melatonin on the radiosensitivity of human colon cancer cells

国际放射医学核医学杂志. 2019, 43(6): 544-551 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.06.009>

MRI影像与CT影像勾画宫颈癌三维腔内后装放疗靶区体积的比较

Comparison of the target volumes delineated by MRI and CT images in patients with cervical cancer who received 3D intracavitary brachytherapy

国际放射医学核医学杂志. 2020, 44(4): 231-235 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-201908031-00024>

靶向PARP-1调控肿瘤细胞放射敏感性的研究进展

Research progress of targeting PARP-1 to regulate radiosensitivity of tumor cells

国际放射医学核医学杂志. 2021, 45(1): 61-66 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-201910019-00009>

· 基础研究 ·

ASTL 抗体中和 ASTL 对人宫颈癌 ME-180 细胞放射敏感性的影响

赵舒雅 李航 樊赛军

中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室 300192

通信作者: 樊赛军, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

【摘要】目的 探讨龙虾肽酶样金属内肽酶(ASTL)抗体中和 ASTL 对人宫颈癌 ME-180 细胞放射敏感性的影响。**方法** 培养人宫颈癌 ME-180、HeLa 细胞, 根据细胞处理方法的不同, 按以下方式进行分组。(1)将 ME-180 细胞分为 4 组: 对照组、照射组(4 Gy)、ASTL 抗体组、ASTL 抗体+照射组(4 Gy), 采用 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)染色、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)实验检测每组细胞的增殖能力与存活情况, 并于照射后 0、24、48、72 h 采用免疫荧光、Western blot 实验检测 ASTL 在细胞中的定位情况。(2)将 ME-180 细胞分为 2 组: 照射组、ASTL 抗体+照射组, 分别进行 0、2、4、8 Gy 照射, 并采用克隆形成实验检测每组细胞的增殖能力。(3)将 HeLa 细胞分为 2 组: 照射组、ASTL 抗体+照射组, 分别进行 0、2、4、8 Gy 照射, 采用 MTT 实验检测细胞的存活情况。(4)将 ME-180 细胞分为 2 组: 短发夹 RNA 对照组(sh-对照组)、短发夹 RNA ASTL 转染组(sh-ASTL组), 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)、Western blot 实验检测蛋白激酶 B(AKT)等靶基因的表达情况; 同时, 分别用 0、5、10 nmol/L 的抗体处理 ME-180 细胞, 采用 Western blot 实验检测抗体中和对靶基因表达情况的影响。(5)将 ME-180 细胞分为 2 组: 对照组、照射组(4 Gy), 采用 Western blot 实验检测 ASTL、AKT 等靶基因的表达情况。以上照射均使用¹³⁷Cs γ 射线照射源, 剂量率为 1 Gy/min。组间比较采用独立样本 *t* 检验。**结果** (1)EdU 染色实验结果显示, 与照射组相比, ASTL 抗体+照射组(4 Gy)抑制了 ME-180 细胞的增殖, 差异有统计学意义($t=9.25$, $P<0.05$); MTT 实验结果显示, 与照射组相比, ASTL 抗体+照射组(4 Gy)在照射后 24、48、72 h 时, ME-180 细胞生长速度明显降低, 且差异均有统计学意义($t=5.17$ 、 10.32 、 14.27 , 均 $P<0.05$)。免疫荧光、Western blot 实验结果显示, 4 Gy 照射后 24 h 时, ME-180 细胞中 ASTL 在细胞质的定位显著增加, 照射后 48~72 h, ASTL 重新定位于细胞膜上。(2)克隆形成实验结果显示, 与照射组相比, ASTL 抗体+照射组能够抑制 8 Gy 照射后 ME-180 细胞的增殖, 且差异有统计学意义($t=7.63$, $P<0.05$)。(3)HeLa 细胞 MTT 实验结果显示, 与照射组相比, ASTL 抗体+照射组能够降低 2、4、8 Gy 照射后 HeLa 细胞的存活率, 且差异均有统计学意义($t=4.27$ 、 9.66 、 15.71 , 均 $P<0.05$)。(4)qRT-PCR 实验结果显示, ASTL 干扰片段转入后, AKT 的表达水平下调($t=13.94$, $P<0.05$), 同时, Western blot 实验结果表明, ASTL 干扰或加入 ASTL 抗体能够降低 AKT 等靶基因的表达水平。(5)Western blot 实验结果显示, 与对照组相比, 照射组(4 Gy)ASTL、AKT 等靶基因的表达水平显著升高。**结论** 人宫颈癌 ME-180 细胞的放射敏感性与 ASTL 的水平相关, ASTL 抗体或 sh-ASTL 能够增强照射后 ME-180 细胞的放射敏感性。

【关键词】 宫颈肿瘤; 辐射耐受性; 抗体; 龙虾肽酶样金属内肽酶

基金项目: 国家自然科学基金(81803046、81730086); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-042)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202009033-00125

Effect of neutralizing ASTL with ASTL antibody on radiosensitivity of human cervical carcinoma ME-180 cells

Zhao Shuya, Li Hang, Fan Saijun

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192,

China

Corresponding author: Fan Saijun, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the antibody neutralization of astacin-like metalloendopeptidase (ASTL) on the radiosensitivity of human cervical carcinoma ME-180 cells. **Methods** ME-180 cells and HeLa cells were grouped as follows in accordance with different experimental treatments: (1) ME-180 cells were divided into the control group, irradiation (4 Gy) group, ASTL antibody group, and ASTL antibody + irradiation (4 Gy) group. The number and proliferative capacity of viable cells were detected via 5-ethynyl-2'deoxyuridine nucleoside (EdU) staining and 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Immunofluorescence and Western blot analyses were used to detect the localization of ASTL in the cells at 0, 24, 48, and 72 h after irradiation. (2) ME-180 cells were divided into two groups: the irradiation group and the ASTL antibody + irradiation group irradiated with 0, 2, 4, and 8 Gy γ -rays. The proliferative capacity of the cells was detected through the clone formation assay. (3) HeLa cells were divided into two groups: the irradiation group and the ASTL antibody + irradiation group irradiated with 0, 2, 4, and 8 Gy γ -rays. MTT assay was used to detect the proliferative capacity of the cells. (4) ME-180 cells were divided into two groups: the sh-control group and the sh-ASTL transfection group. Protein kinase B expression levels were analyzed through quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot analyses; at the same time, ME-180 cells were treated with 0, 5, 10 nmol/L antibodies respectively, and the effect of antibody neutralization on target gene expression was detected by western blot test. (5) ME-180 cells were divided into two groups: the control group and the irradiation (4 Gy) group. Western blot analysis was used to detect ASTL and AKT expression. For the relative experiments, the cells were treated with ^{137}Cs γ -ray irradiation at the dose rate of 1 Gy/min. Independent samples *t*-test was used for comparison between two groups. **Results** (1) The results of the EdU staining experiments showed that neutralizing ASTL significantly inhibited the proliferation of ME-180 cells after irradiation ($t=9.25$, $P<0.05$). The results of the MTT assay validated that the proliferative capacity of the ASTL antibody + irradiation group (4 Gy) was significantly ($t=5.17$, 10.32 , 14.27 ; all $P<0.05$) reduced compared with that of the irradiation group after 24, 48, and 72 h of irradiation. The results of immunofluorescence and Western blot analyses revealed that the cytoplasmic localization of ASTL in ME-180 cells was significantly enhanced after 24 h of 4 Gy irradiation, and ASTL was relocalized on the cell membrane after 48–72 h of irradiation. (2) The results of the clone formation assay demonstrated that ASTL antibodies could significantly reduce the survival rate of ME-180 cells after 8 Gy irradiation ($t=7.63$, $P<0.05$). (3) The results of the MTT assay showed that ASTL antibodies could significantly reduce the survival rates of HeLa cells after 2, 4, and 8 Gy irradiation ($t=4.27$, 9.66 , 15.71 ; all $P<0.05$). (4) qRT-PCR analysis revealed that the expression level of AKT was significantly ($t=13.94$, $P<0.05$) down-regulated after ASTL interference, whereas the results of Western blot analysis showed that ASTL interference or ASTL antibody addition could reduce the protein expression levels of AKT and its target genes. (5) The results of Western blot analysis demonstrated that in ME-180 cells, the levels of the ASTL protein and AKT and its target genes significantly increased after 4 Gy irradiation. **Conclusion** The radiosensitivity of human cervical cancer ME-180 cells was correlated with the level of ASTL, and ASTL antibody or sh-ASTL could enhance the radiosensitivity of ME-180 cells after irradiation.

【Key words】 Uterine cervical neoplasms; Radiation tolerance; Antibodies; Astacin-like metalloendopeptidase

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81803046, 81730086); Chinese Academy of Medical Sciences Medical and Health Sciences and Technology Innovation Project (2021-I2M-1-042)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202009033-00125](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202009033-00125)

宫颈癌是世界上最常见的女性恶性肿瘤之一,居全球女性癌症患者病死原因的第二位^[1],在发展中国家尤为常见。近年来,我国宫颈癌患者也逐渐增多,每年病死于宫颈癌的患者约有5万例^[2],且患者年龄呈年轻化趋势。从病因角度分析,约有95%的患者因人乳头瘤状病毒(HPV)感染罹患宫颈癌,部分感染者体内的人乳头瘤状病毒(HPV)随时间延长而被清除,还有部分患者因持续感染导致宫颈癌变^[3]。放疗是治疗宫颈癌的常用方法,但约有30%的晚期宫颈癌患者经放疗后出现肿瘤复发和转移,导致预后不佳,严重影响患者的生存质量^[4]。因此,如何有效增强宫颈癌细胞的放射敏感性,减少放疗对正常组织的放射损伤及放疗后的不良反应,提高放疗的疗效,成为亟待解决的问题。

龙虾肽酶样金属内肽酶(astacin-like metallo-endopeptidase, ASTL)是一类与卵母细胞表面相关的锌基质金属蛋白酶。ASTL基因编码含有431个氨基酸、相对分子质量为46 000的蛋白产物。生物信息学结构预测结果表明,ASTL蛋白由N端信号肽、含有催化位点模序的蛋白酶功能区和C末端多肽组成^[5]。ASTL的基因序列在不同物种间相对保守(如人与小鼠的同源率高达75.2%),但基因的组织表达特异性显著,同时ASTL蛋白可以在精卵相互作用时发挥功能,并在受精过程中阻止多精入卵^[6]。有研究表明,ASTL在肿瘤和正常细胞中存在表达差异,其表达水平与子宫癌、卵巢癌等癌症的发生发展相关,并可作为诊断子宫癌的生物标志物;同时由于膜蛋白易与抗体结合,加入蛋白抗体可促进ASTL在溶酶体中的降解,进而影响子宫癌细胞的生长,因此ASTL还可以作为子宫癌免疫治疗的一种新型药物靶点^[7-8]。本研究探讨ASTL蛋白在人宫颈癌ME-180细胞抵抗辐射中的作用,旨在为宫颈癌及ASTL与放疗增敏的相关临床与基础研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM液体培养基、胎牛血清均购自以色列Biological生物科技有限公司;青链霉素双抗购自美国Hyclone公司;Hoechst 33342反应液、二甲基亚砜、谷氨酰胺、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide, MTT]溶液、RIPA裂解液、蛋白加样缓冲液、Triton X-100、牛血清白蛋白、抗荧光衰减封片剂均购自北京索莱宝科技有限公司;Lipofectamine 3000、Trizol试剂均购自美国Invitrogen生命技术有限公司;ECL超敏发光液购自白鲨生物科技有限公司;短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)ASTL(sh-ASTL)质粒购自苏州金唯智生物科技有限公司;cDNA合成试剂盒购自日本TaKaRa公司;实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒、聚偏氟乙烯(PVDF)膜均购自美国赛默飞世尔科技公司;兔抗人ASTL抗体购自上海沪震生物科技有限公司;磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, pAKT)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体均购自美国Proteintech公司;AKT抗体、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)1抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G及荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G均购自英国Abcam公司;5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)试剂盒购自南京恩晶科技生物有限公司;细胞膜蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒均购自上海贝博生物科技有限公司。Gammacell[®]40 Exactor¹³⁷Cs γ 射线照射源,剂量率为1 Gy/min,购自加拿大Best Theratronics公司;RT-6500酶标分析仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;D3024R离心机购自大龙兴创实验仪器北京股份公司;TCS SP5激光扫描共聚焦显微镜购自德国徕卡公司。

1.2 细胞培养、分组和照射

人宫颈癌HeLa细胞、ME-180细胞均购自美国模式菌种收集中心。用含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的DMEM液体培养基培养ME-180细胞;用含10%胎牛血清、3%谷氨酰胺、1%青链霉素双抗的DMEM液体培养基培养HeLa细胞。培养条件为5% CO₂、37℃恒温培养,细胞铺满培养瓶约80%时进行传代亚培养。

根据细胞处理方法的不同,按以下方式进行分组。(1)将ME-180细胞分为4组:对照组、照射组(4 Gy)、ASTL抗体组和ASTL抗体+照射组(4 Gy),采用EdU染色、MTT实验检测细胞的存活情况和增殖能力,并于照射后0、24、48、72 h

采用免疫荧光、Western blot 实验检测 ASTL 在细胞中的定位情况。(2)将 ME-180 细胞分为 2 组: 照射组、ASTL 抗体+照射组, 分别进行 0、2、4、8 Gy 照射, 并采用克隆形成实验检测每组细胞的增殖能力。(3)将 HeLa 细胞分为 2 组: 对照组、ASTL 抗体组, 分别进行 0、2、4、8 Gy 照射, 采用 MTT 实验检测细胞的存活情况。(4)将 ME-180 细胞分为 2 组: 短发夹 RNA 对照组(sh-对照组)、短发夹 RNA ASTL 转染组(sh-ASTL 组), 采用 qRT-PCR、Western blot 实验检测 AKT 等靶基因的表达; 同时, 分别用 0、5、10 nmol/L 的抗体处理 ME-180 细胞, 采用 Western blot 实验检测抗体中和对靶基因表达情况的影响。(5)将 ME-180 细胞分为 2 组: 对照组、照射组(4 Gy), 采用 Western blot 实验检测 ASTL、AKT 等靶基因的表达情况。

以上除第(4)组实验提到的抗体浓度, 其他实验所用抗体浓度均为 5 nmol/L。所有照射均使用 ^{137}Cs γ 射线照射源, 剂量率为 1 Gy/min。

1.3 EdU 染色实验

将接受不同处理后且处于对数生长期的 ME-180 细胞, 按 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 4 Gy 照射后 24 h 进行 EdU 染色实验。制备适量 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EdU 培养基, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; PBS 洗 2 次, 每次 5 min; 加入 50 μL 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 固定完成后弃去细胞固定液; 加入 3% 牛血清白蛋白洗 2 次; 加入 100 μL 0.5% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 10 min; 加入 100 μL PBS, 脱色摇床洗 5 min; 加入 100 μL $1 \times \text{X}$ Apollo[®] 染色反应液, 室温、避光条件下, 脱色摇床孵育 30 min; 弃除染色反应液后, 加入渗透剂(0.5% Triton X-100 的 PBS), 每孔 100 μL , 室温反应 10 min, 除去渗透剂; 加入 100 μL 的甲醇洗 2 次, 每次 5 min; 加入 100 μL PBS 洗涤, 5 min; 加入 100 μL $1 \times \text{Hoechst}$ 33342 反应液, 摇床孵育 30 min, 注意避光, 弃去反应液; 加入 100 μL PBS 清洗 2 次。染色完成后, 立即观察并获取图像。

1.4 MTT 实验

ME-180 细胞、HeLa 细胞接受不同剂量(0、2、4、8 Gy)的射线照射后, 按 3×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 20 h 后, 每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 恒温培养箱中培养 4 h, 加

入 100 μL 二甲基亚砜, 摇床低速振摇 10 min。使用酶标仪检测各组细胞在 490 nm 处的吸光度。

1.5 克隆形成实验

ME-180 细胞接受不同剂量(0、2、4、8 Gy)的射线照射后, 立即将约 2000 个不同处理组的细胞接种至 60 mm 的培养皿中。细胞连续培养 3 周至出现肉眼可见的克隆时, 弃掉培养基用甲醇固定 30 min, 加姬姆萨应用液染色 30 min, 流水洗净, 计数细胞数 ≥ 50 个作为 1 个克隆, 计算克隆数。细胞克隆形成率=照射细胞克隆数/未照射同种细胞克隆数 $\times 100\%$ 。

1.6 免疫荧光实验

将 1×10^5 个 ME-180 细胞接种到放置有盖玻片的 6 孔板中, 24 h 后进行 4 Gy 照射 4 min。(1)分别在照射后 0、24、48、72 h 去掉培养基, PBS 清洗 2 次, 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 室温下固定 15 min。(2)0.3% Triton X-100 室温下处理细胞 15 min, 5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h。(3)加入兔抗人 ASTL 抗体(1:400 稀释)30 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(1:1000 稀释), 室温孵育 1 h, PBS 清洗。(4)PBS 中摇晃清洗 3 次, 滴加 50 μL 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液于盖玻片, 室温孵育 30 min。(5)PBS 中摇晃清洗 3 次, 用 30 μL 抗荧光衰减封片剂进行封片, 干燥后于荧光显微镜下观察。使用激光扫描共聚焦显微镜观察照射后不同时间点(0、24、48、72 h) ASTL 在细胞中的定位情况。

1.7 Western blot 实验

PBS 清洗处理后的 ME-180 细胞, 将 150 μL /孔 RIPA 裂解液加入 6 孔板, 并置于冰上裂解细胞 2 h, 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液。加入等体积的 2 倍浓度的蛋白加样缓冲液, 沸水煮沸 5 min, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电泳结束后转膜, 将聚偏氟乙烯(PVDF)膜切成凝胶大小, 在 100% 甲醇中预浸一下后浸泡在缓冲液中, 保持膜和凝胶湿润; 转膜结束后, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 依次加入兔抗人 ASTL 抗体(1:400 稀释)、AKT 抗体、pAKT 抗体、ERK1 抗体(均为 1:1000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 TBST(Tris buffered saline with tween)缓冲液洗 3 次, 每次 15 min; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋

白 G(1 : 2000 稀释)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 15 min; 用 ECL(enhanced chemiluminescent) 发光法检测蛋白的表达。

1.8 细胞转染和抗体处理

转染前 1 d, 将密度为 1×10^5 个/mL 的 ME-180 细胞接种于 6 孔板中, 使转染时的细胞密度保持在 70% 左右。用 125 μ L 无血清无抗生素的 DMEM 培养基分别与 3.75 μ L、7.5 μ L 的 Lipofectamine 3000 混合, 混匀后室温下孵育 5 min, 为 A 液; 用 125 μ L 无血清无抗生素的 DMEM 培养基稀释 sh-ASTL, 1 μ g/孔 sh-ASTL, 混匀后孵育 5 min, 为 B 液; 将 A、B 溶液混匀即为转染液, 孵育 30 min。转染时去掉 6 孔板中的培养基, PBS 洗 2~3 次, 每孔加入约 2 mL 无血清无抗生素的 DMEM 培养基, 将孵育后的转染液加入 6 孔板中, 轻轻摇晃混合; 于 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 恒温培养箱中培养 4~6 h 后换为含血清、青链霉素双抗的 DMEM 培养基培养^[9]。24 h 后收集细胞, 检测 ME-180 细胞中 AKT、ASTL 等 mRNA 与靶基因的表达情况。同时, 分别用 0、5、10 nmol/L 的抗体处理 ME-180 细胞, 检测抗体中和对靶基因表达情况的影响。

1.9 qRT-PCR 检测 AKT 表达

将 700 μ L/孔 Trizol 试剂加入 6 孔板裂解细胞, 提取细胞总 RNA, 将提取的 RNA 按照 cDNA 合成试剂盒说明书反转录生成 cDNA, 将甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)mRNA 的表达量作为内参。进行 qRT-PCR, 分析其扩增曲线和融解曲线。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 40 次, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。实验所需引物来源于 GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 以及 miRBase(<https://www.mirbase.org>) 数据库, 通过 Primer Premier 5 软件(购自美国 PREMIER Biosoft 公司)进行引物设计, 具体序列见表 1。

1.10 细胞膜和细胞质蛋白的提取

取 $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 个经 5 nmol/L 兔抗人 ASTL 抗体处理的 ME-180 细胞, 在 4 $^{\circ}$ C、500 \times g 条件下离心 3 min, 小心去除培养基, 收集细胞。用冷 PBS 洗涤细胞 2 次。按照细胞膜蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。细胞样品中加入 200 μ L 冷的试剂 A、2 μ L 蛋白酶抑制剂混合物、2 μ L 蛋白稳定剂, 高速涡旋振荡 15 s, 置冰上 10 min。

表 1 mRNA 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primers for quantitative real-time PCR analysis of the mRNA

引物名称	引物序列(5'→3')
GAPDH-F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
GAPDH-R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
AKT-F	AAACCTGGCGGCCACGCTAC
AKT-R	TTGGCCAGGGCCACCTCCAT
ATM-F	CAGGGTAGTTTAGTTGAGG
ATM-R	AATACTGGACTGGTGCTT
PDK1-F	AGATGAGTGACCGAGGAG
PDK1-R	TTATACACTGGGAGTCTTTCT
PDK2-F	TGGGTAATGAGGATTTGACT
PDK2-R	GCTTTGTTATACACTGGGAGT
ERK1-F	ATTCCCGCCTCTACGCC
ERK1-R	GCTCCCTCGCAACTATC
ERK2-F	CTGGACCGCTTCTACCTC
ERK2-R	GTCGCTCAATCTTCTCAA
CHK1-F	ATGAGTCTCTCGCAGGTGTCACCTT
CHK1-R	AAGGTGACACCTGCGAGAGACTCAT
CHK2-F	GGCGGTGAAGTGTGTTGAT
CHK2-R	TGTAGTCGTGCGAGAAGG
PTEN-F	CTGGAAAGGGACGAAGT
PTEN-R	GGTAACGGCTGAGGGAAC
Survivin-F	TTAGGAGGAAAGATGGTA
Survivin-R	TTCGGAGTAGGTTCAAGT

注: PCR 为聚合酶链反应; GAPDH 为甘油醛 3-磷酸-脱氢酶; AKT 为蛋白激酶 B; ATM 为共济失调毛细血管扩张突变基因; PDK1 为 3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1; PDK2 为 3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶 2; ERK1 为细胞外信号调节激酶 1; ERK2 为细胞外信号调节激酶 2; CHK1 为沉默细胞周期检测点激酶 1; CHK2 为沉默细胞周期检测点激酶 2; PTEN 为人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因; Survivin 为凋亡抑制蛋白存活素

再次高速涡旋振荡 5 s, 然后在 4 $^{\circ}$ C、13 000 \times g 条件下离心 5 min。快速将上清转移至另一预冷的干净离心管, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min, 37 $^{\circ}$ C 下 2 000 \times g 离心 5 min, 此时溶液分为两层(对着光线看), 下层相约为 20 μ L, 收集上层相, 即为细胞质蛋白。用 150~200 μ L 冷的试剂 B 稀释下层相, 混匀后冰浴 2 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 37 $^{\circ}$ C 下 22 000 \times g 离心 5 min, 此时溶液分为两层(对着光线看), 下层相约为 20 μ L, 用 100 μ L 冰冷的试剂 C 稀释下层相, 即得细胞膜蛋白。

1.11 统计学分析

应用 IBM SPSS Statistics 21.0 软件进行统计学分析。数据均符合正态分布、方差齐性检验后, 组

间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASTL 对宫颈癌细胞放射敏感性的影响

EdU 染色实验结果显示, ASTL 抗体组与对照

组比较, 差异无统计学意义 ($t=2.45, P>0.05$), 照射组 (4 Gy) 和 ASTL 抗体组与 ASTL 抗体+照射组 (4 Gy) 比较, 细胞增殖的差异均有统计学意义 ($t=9.25、11.16$, 均 $P<0.05$) (图 1A)。MTT 实验结果显示, 与对照组相比, 照射后 24、48、72 h 时照射组 (4 Gy) 和 ASTL 抗体组 ME-180 细胞增殖速

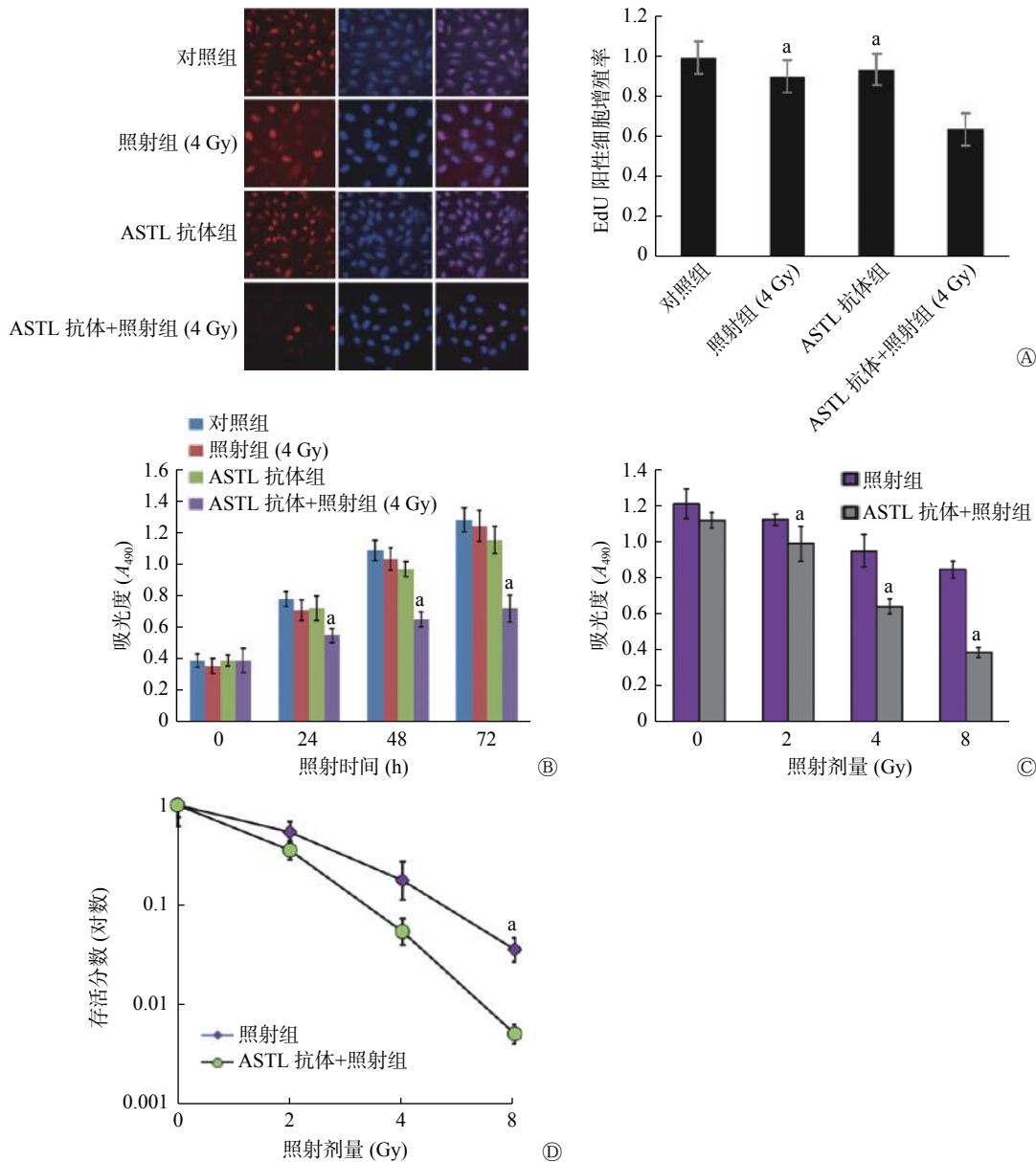


图 1 ASTL 抗体对人宫颈癌 ME-180 和 HeLa 细胞放射敏感性的影响 A 为 EdU 染色实验检测 ME-180 细胞在接受不同条件处理后细胞的增殖情况, 左图中从左到右依次为 EdU 染色、Hoechst 活细胞染色及二者合并图, 右图为阳性细胞计数结果, ^a 表示与 ASTL 抗体+照射组比较, 差异均有统计学意义 ($t=9.25、11.16, P<0.05$); B 为 MTT 实验检测 ME-180 细胞在接受不同条件处理后的细胞存活情况, ^a 表示与照射组比较, 差异均有统计学意义 ($t=5.17、10.32、14.27$, 均 $P<0.05$); C 为 MTT 实验检测 HeLa 细胞在接受不同条件处理后的细胞存活情况, ^a 表示与照射组比较, 差异均有统计学意义 ($t=4.27、9.66、15.71$, 均 $P<0.05$); D 为克隆形成实验检测 ASTL 抗体对不同剂量照射后 ME-180 细胞增殖能力的影响, ^a 表示与照射组比较, 差异有统计学意义 ($t=7.63, P<0.05$)。ASTL 为龙虾肽酶样金属内肽酶; EdU 为 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷; Hoechst 为赫斯特活细胞染色; MTT 为 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐

Figure 1 Effect of astacin-like metalloendopeptidase antibody on radiosensitivity of human cervical cancer ME-180 and HeLa cells

度的差异均无统计学意义($t=2.16、2.33、2.57$, 均 $P>0.05$; $t=2.11、2.43、2.77$, 均 $P>0.05$); 而与照射组相比, ASTL 抗体+照射组(4 Gy)ME-180 细胞的生长速度明显降低, 且差异均有统计学意义($t=5.17、10.32、14.27$, 均 $P<0.05$)(图 1B)。在 HeLa 细胞的 MTT 实验中也得到同样的结果, 与照射组相比, ASTL 抗体+照射组 2、4、8 Gy 受照射细胞的生长受到显著抑制, 差异均有统计学意义($t=4.27、9.66、15.71$, 均 $P<0.05$)(图 1C)。ME-180 细胞的克隆形成实验结果显示, 与照射组相比, ASTL 抗体+照射组能够显著抑制 8 Gy 照射后 ME-180 细胞的增殖, 差异有统计学意义($t=7.63, P<0.05$)(图 1D)。以上实验结果表明, ASTL 抗体能够通过中和 ASTL 抑制照射后 ME-180 细胞的生长

和增殖, 初步揭示 ASTL 在受到照射后的 ME-180 细胞的生长和增殖过程中发挥了重要的调控作用。

2.2 ASTL 在照射后的 ME-180 细胞中的表达水平及定位

免疫荧光、Western blot 实验结果显示, ME-180 细胞经 4 Gy 照射后, ASTL 蛋白在 ME-180 细胞中的定位发生转移。照射后 0 h 时, 标记 ASTL 蛋白的绿色荧光位于细胞膜; 24 h 后, 细胞膜绿色荧光强度降低, 细胞质绿色荧光强度升高; 照射后 48~72 h, ASTL 重新定位在细胞膜上(图 2A、B)。Western blot 实验结果显示, ASTL 抗体加入后, 细胞总蛋白量下降, ASTL 蛋白在细胞质与细胞膜的定位数减少, 照射后 24 h, ASTL 蛋白在细胞质中的定位数增加, 但低于照射组(图 2C)。以上实

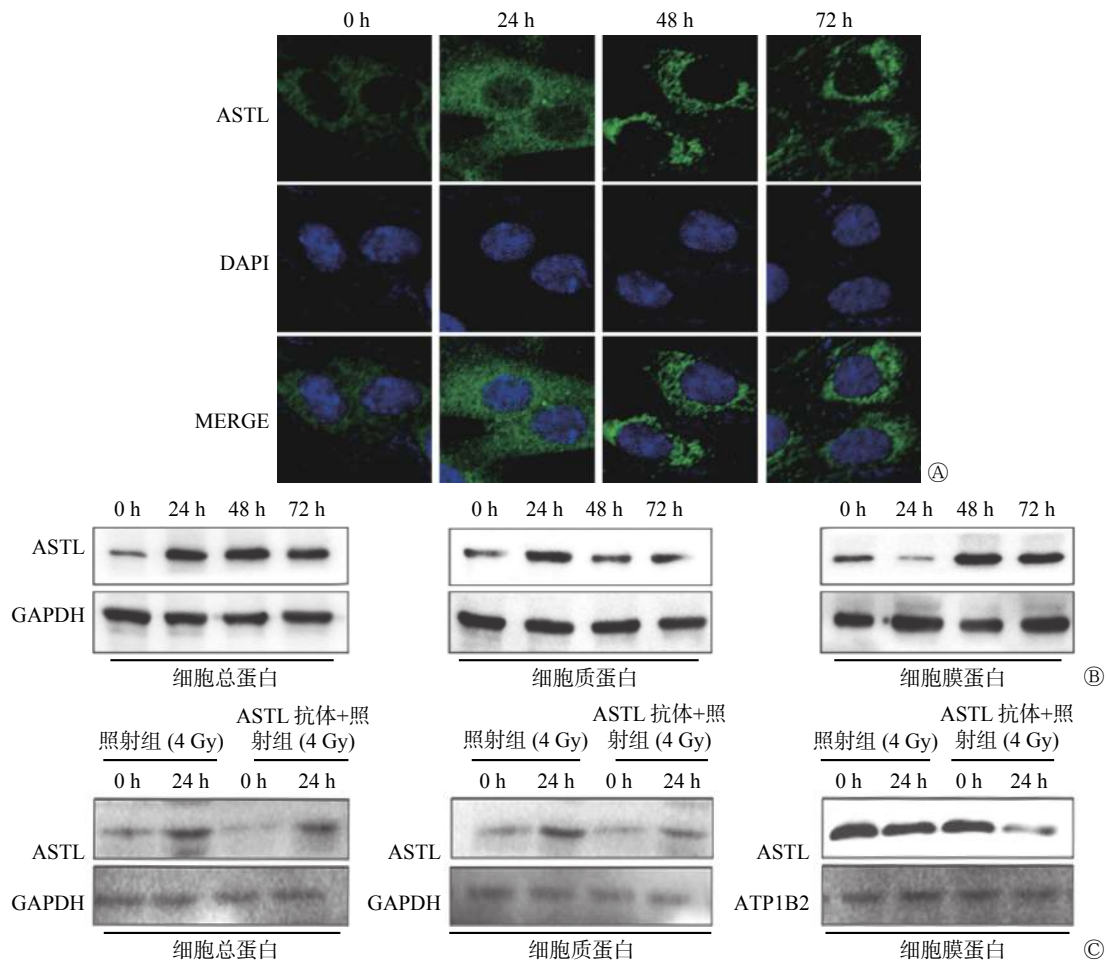


Figure 2 Effect of 4 Gy γ -rays on the localization of astacin-like metalloendopeptidase protein in human cervical epidermal cancer ME-180 cells

验结果表明,照射后的 ME-180 细胞中 ASTL 蛋白水平上调,定位由细胞膜转移至细胞质,且发挥功能后又重新定位至细胞膜。重新定位后,ASTL 蛋白量与转移前无明显差异。

2.3 ASTL 转移至细胞质后对 AKT 等靶基因表达水平及其信号通路的影响

采用 qRT-PCR 实验检测 ASTL 干扰后细胞中与辐射抵抗相关的部分癌基因的表达水平变化情况,结果显示,ASTL 干扰片段转入后,ME-180 细胞中与肿瘤发生相关的基因表达水平下降最明显的为 AKT,差异有统计学意义($t=13.94, P<0.05$) (图 3A)。通过 Western blot 实验进一步检测了 ASTL 对 AKT 信号通路中相关靶基因的调控作用,结果显示,ASTL 干扰或加入 ASTL 抗体对辐射后 ME-180 细胞的 AKT 等靶基因的表达水平下调作用显著(图 3B)。ME-180 细胞接受 4 Gy 照射后,结果显示,与对照组相比,照射组(4 Gy)ASTL、

AKT 等靶基因的表达水平显著升高(图 3C)。综上所述,ASTL 抗体或 sh-ASTL 可通过中和 ASTL 抑制 AKT 信号通路,从而增强 ME-180 细胞的放射敏感性。

3 讨论

宫颈癌的基本治疗方法为放疗和手术治疗。放疗通过能量的释放阻止细胞生长并破坏癌细胞的生物学功能,从而达到抑制肿瘤生长,使其减小甚至消失的目的^[9-10]。目前放疗已成熟应用于多种肿瘤治疗中。对于一些无法进行手术的晚期宫颈癌患者来说,放疗也能缓解疼痛,延长寿命,并提高患者生存质量^[11-12]。目前,放疗在宫颈癌的临床应用中仍存在许多问题。尤其随着放疗过程的进展,宫颈癌患者的癌细胞的放射敏感性逐渐降低,肿瘤瘤体持续快速生长,发生浸润或转移,再次降低了患者的生存质量^[13-14]。

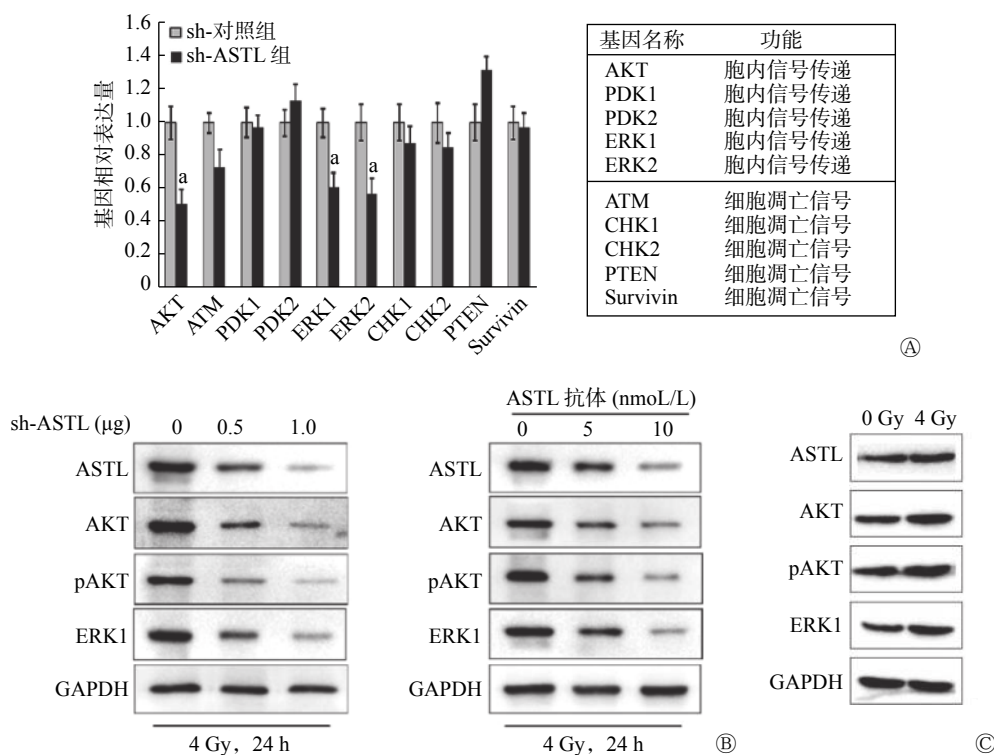


图 3 Sh-ASTL 或 ASTL 抗体对人宫颈癌 ME-180 细胞中 AKT 等靶基因表达的影响 A 为 qRT-PCR 实验检测 ME-180 细胞中干扰 ASTL 后相关基因的表达水平变化, ^a 表示与 sh-对照组比较, 差异均有统计学意义 ($t=13.94, 6.37, 9.16$, 均 $P<0.05$); B 为 ME-180 细胞接受 4 Gy γ 射线照射后 24 h 时, Western blot 实验检测 ASTL 干扰或抗体中和对 AKT 信号通路中相关基因表达水平的影响; C 为 4 Gy γ 射线照射对 ASTL、AKT 等基因表达水平的影响。AKT 为蛋白激酶 B; ATM 为共济失调毛细血管扩张突变基因; PDK 为 3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶; ERK 为细胞外信号调节激酶; CHK 为沉默细胞周期检测点激酶; PTEN 为人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因; Survivin 为凋亡抑制蛋白存活素; ASTL 为龙虾肽酶样金属内肽酶; sh-ASTL 为用短发夹 RNA 敲降 ASTL; pAKT 为磷酸化蛋白激酶 B; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Effect of Sh-ASTL or ASTL antibody on the expression of protein kinase B gene and other target genes in human cervical cancer ME-180 cells

在前期研究中,我们通过人蛋白质图谱(HPA)、癌症基因图谱(TCGA)及肿瘤芯片(Scotto Cervix)数据库获取了ASTL基因在多种临床肿瘤组织中的表达情况,其中,ASTL基因在宫颈癌中的异常表达最为显著,因此,我们选择人宫颈癌ME-180细胞作为研究对象。通过人为加入ASTL抗体中和膜蛋白ASTL,证实了ASTL抗体对ME-180细胞的放射敏感性具有影响,且随着照射剂量的增大,实验组与对照组细胞的存活与增殖情况差异愈显著。随后转入ASTL干扰片段,对ME-180细胞中与宫颈癌发生相关的基因表达变化情况进行了研究,结果显示,AKT等靶基因的表达水平下调显著。

磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT通路是癌症发展和治疗中最重要的激酶信号网络之一,AKT是这一通路的中心介质,其异常激活与许多恶性肿瘤有关,包括肺癌^[15]、肝癌^[16]、乳腺癌^[17]、鼻咽癌^[18]和宫颈癌^[19]等。活化的AKT可参与细胞的生长和增殖^[20],调控细胞凋亡^[21]进程,并与肿瘤的侵袭、转移和血管生成等相关,参与多种生物学进程。目前也有研究结果证实,AKT与肿瘤化疗耐药^[22]和辐射抵抗^[20]相关,特别是其参与的信号通路在辐射抵抗中起关键作用^[23]。本研究结果显示, γ 射线照射后,ASTL干扰显著降低 γ 射线照射后ME-180细胞的存活与增殖能力,ASTL抗体的增敏作用随浓度增加而增强,并伴随AKT等靶基因的表达水平降低。这一结果提示,ASTL通过影响AKT信号通路介导宫颈癌细胞的辐射抵抗。且本研究结果发现, γ 射线照射后,ASTL在细胞中的表达水平升高,并由细胞膜向细胞质转移。在今后的研究中,应进一步对照射后转移到细胞质的ASTL蛋白功能开展研究,并且采用更为多样的实验方法进行评估,深入探究其机制。

综上所述,本研究结果证实ME-180细胞的放射敏感性与ASTL的表达水平相关,且照射后细胞的ASTL、AKT表达水平升高,而人为中和ASTL后,ME-180细胞抵抗辐射的能力降低,放射敏感性显著提高。因此,随着ASTL对宫颈癌放射敏感性调控机制相关研究的深入,其或可作为治疗宫颈癌的新靶点,这具有非常重要的基础研究价值和临床意义,将为解决宫颈癌放疗中细胞辐射抵抗的难题奠定理论基础。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 赵舒雅、李航负责实验的实施、论文的撰写;樊赛军负责课题设计的指导、论文的审阅与修改。

参 考 文 献

- [1] Kontostathi G, Zoidakis J, Makridakis M, et al. Cervical cancer cell line secretome highlights the roles of transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3, peroxiredoxin-2, and NRF2 on cervical carcinogenesis[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 4180703. DOI: 10.1155/2017/4180703.
- [2] Holt HK, Zhang L, Zhao FH, et al. Evaluation of multiple primary and combination screening strategies in postmenopausal women for detection of cervical cancer in China[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(3): 544-554. DOI: 10.1002/ijc.30468.
- [3] Zhang Q, Zhao MY, Cao D, et al. Assessment of the effectiveness of HPV16/18 infection referred for colposcopy in cervical cancer screening in Northwest of China[J]. *J Med Virol*, 2018, 90(1): 165-171. DOI: 10.1002/jmv.24902.
- [4] Creutzberg CL, Lu KH, Fleming GF. Uterine Cancer: adjuvant therapy and management of metastatic disease[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(27): 2490-2500.
- [5] Körschgen H, Kuske M, Karmilin K, et al. Intracellular activation of ovastacin mediates pre-fertilization hardening of the zona pellucida[J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(9): 607-616. DOI: 10.1093/molehr/gax040.
- [6] Sachdev M, Mandal A, Mulders S, et al. Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization[J]. *Dev Biol*, 2012, 363(1): 40-51. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.12.021.
- [7] Pires ES, D'Souza RS, Needham MA, et al. Membrane associated cancer-oocyte neoantigen SAS1B/ovastacin is a candidate immunotherapeutic target for uterine tumors[J/OL]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 30194-30211[2020-09-16]. <https://www.oncotarget.com/article/4734/text>. DOI: 10.18632/oncotarget.4734.
- [8] Kristjansdottir B, Levan K, Partheen K, et al. Potential tumor biomarkers identified in ovarian cyst fluid by quantitative proteomic analysis, iTRAQ[J]. *Clin Proteomics*, 2013, 10(1): 4. DOI: 10.1186/1559-0275-10-4.
- [9] Kadkhodayan S, Shandiz FH, Toussi MS, et al. Concurrent chemoradiotherapy without brachytherapy in locally advanced cervical cancer[J]. *Iran J Cancer Prev*, 2013, 6(4): 195-200.
- [10] Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM, et al. Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(11): 992-1004. DOI: 10.1158/2326-6066.
- [11] Ghorbani M, Behmadi M. Evaluation of hypothetical ¹⁵³Gd source for use in brachytherapy[J]. *Rep Pract Oncol Radiother*,

- 2016, 21(1): 17–24. DOI: [10.1016/j.rpor.2015.05.005](https://doi.org/10.1016/j.rpor.2015.05.005).
- [12] Huo JH, Giordano SH, Smith BD, et al. Contemporary toxicity profile of breast brachytherapy versus external beam radiation after lumpectomy for breast cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016, 94(4): 709–718. DOI: [10.1016/j.ijrobp.2015.12.013](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.12.013).
- [13] Leung THY, Tang HWM, Siu MKY, et al. Human papillomavirus E6 protein enriches the CD55(+) population in cervical cancer cells, promoting radioresistance and cancer aggressiveness[J]. *J Pathol*, 2018, 244(2): 151–163. DOI: [10.1002/path.4991](https://doi.org/10.1002/path.4991).
- [14] Tyagi A, Vishnoi K, Kaur H, et al. Cervical cancer stem cells manifest radioresistance: association with upregulated AP-1 activity[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4781[2020-09-16]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05162-x>. DOI: [10.1038/s41598-017-05162-x](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05162-x).
- [15] Kuang JY, Min L, Liu CY, et al. RNF8 promotes epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via stabilization of slug[J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(11): 1638–1649. DOI: [10.1158/1541-7786.MCR-19-1211](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-1211).
- [16] Hao WC, Zhong QL, Pang WQ, et al. MST4 inhibits human hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces cell cycle arrest via suppression of PI3K/AKT pathway[J/OL]. *J Cancer*, 2020, 11(17): 5106–5117[2020-09-16]. <https://www.jcancer.org/v11p5106.htm>. DOI: [10.7150/jca.45822](https://doi.org/10.7150/jca.45822).
- [17] Yang Y, Tian ZY, Guo R, et al. Nrf2 inhibitor, brusatol in combination with trastuzumab exerts synergistic antitumor activity in HER2-positive cancers by inhibiting Nrf2/HO-1 and HER2-AKT/ERK1/2 pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9867595. DOI: [10.1155/2020/9867595.eCollection](https://doi.org/10.1155/2020/9867595.eCollection)
- [18] Lv BT, Li FZ, Liu XL, et al. The tumor-suppressive role of microRNA-873 in nasopharyngeal carcinoma correlates with downregulation of ZIC2 and inhibition of AKT signaling pathway[J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(1/2): 74–88. DOI: [10.1038/s41417-020-0185-8](https://doi.org/10.1038/s41417-020-0185-8).
- [19] Amirani E, Hallajzadeh J, Asemi Z, et al. Effects of chitosan and oligochitosans on the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in cancer therapy[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 456–467. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2020.07.137](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.137).
- [20] Ghasemi Z, Tahmasebi-Birgani MJ, Novin AG, et al. Fractionated radiation promotes proliferation and radioresistance in bystander A549 cells but not in bystander HT29 cells[J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118087. DOI: [10.1016/j.lfs.2020.118087](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118087).
- [21] He Y, Ma MD, Yan YG, et al. Combined pre-conditioning with salidroside and hypoxia improves proliferation, migration and stress tolerance of adipose-derived stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9958–9971. DOI: [10.1111/jcmm.15598](https://doi.org/10.1111/jcmm.15598).
- [22] Tsai JL, Lee YM, Pan CY, et al. The novel VEGF₁₂₁-VEGF₁₆₅ fusion attenuates angiogenesis and drug resistance via targeting VEGFR2-HIF-1 α -VEGF₁₆₅/Lon signaling through PI3K-AKT-mTOR pathway[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, 16(3): 275–286. DOI: [10.2174/156800961603160206125352](https://doi.org/10.2174/156800961603160206125352).
- [23] Yang L, Yang GH, Ding YJ, et al. Inhibition of PI3K/AKT signaling pathway radiosensitizes pancreatic cancer cells with ARID1A deficiency *in vitro*[J/OL]. *J Cancer*, 2018, 9(5): 890–900[2020-09-16]. <https://www.jcancer.org/v09p0890.htm>. DOI: [10.7150/jca.21306](https://doi.org/10.7150/jca.21306).

(收稿日期: 2020-09-17)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于关键词的使用

1. 关键词是为了便于编制文献索引、检索和阅读而选取的能反映文章主题概念的词或词组。一般每篇论文选取 2~5 个关键词。中英文关键词应一致。

2. 关键词尽量从美国国立医学图书馆的 Mesh 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh>)中选取, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用, 建议排在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。

3. 应特别注意首标关键词的选用, 该词应反映全文最主要的内容; 切勿将副主题词当作关键词列出。未被词表收录的词(自由词), 必要时可作为关键词使用, 但排序应在最后。

本刊编辑部